

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：37104
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659313
 研究課題名（和文） トランス・スプライシングを受ける遺伝子群の新規システムによる体系的探索
 研究課題名（英文） Development of a novel method for high-throughput discovery of trans-spliced RNAs in mammalian cells
 研究代表者
 今村 理恵（IMAMURA RIE）
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：70309764

研究成果の概要（和文）：

トランス・スプライシングを受ける遺伝子群の体系的探索・発見を可能とする新規ベクターシステムを開発した。本システムは環状化 DNA の結合両末端（メイトペア）解析を基本とし、対象組織からの環状化 cDNA ライブラリーにおけるメイトペア塩基配列解析から未知の融合転写産物（fusion mRNA）を発見する。特徴は、ライブラリーの各 cDNA 単分子に固有の塩基配列を導入し、2段階の核酸連結（ligation）を行い、単分子のみの環状化 cDNA 形成を許し、正確なメイトペアの配列解析を可能とすることである。本システムは、未知のトランス・スプライシング遺伝子の発見を可能にする新規の方法であり、本法の応用によりヒト造血幹細胞においてトランス・スプライシングを受ける遺伝子候補の発見に成功している。トランス・スプライシング遺伝子群の生成・変化を包括的に捉えることから、“fusion transcriptome” という新しい遺伝子検査分野の開拓が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We developed a novel method for high-throughput discovery of trans-spliced RNAs in mammalian cells. Our method is based on a mate-pair analysis, which enables us to collect information of both ends of DNA fragments. In conventional mate-pair analysis, there must contain circularized DNAs derived from multiple DNAs and those mate-pair fragments can be a cause of false positive trans-spliced genes. To solve this problem we developed a novel method, which allows us to prepare circularized DNA libraries in which each circularized DNA is originated from each single DNA. By this method, we can make a systematic survey of the presence of trans-spliced RNAs in mammalian cells in a highly precise manner, and we could find out several candidate genes in hematopoietic stem cells. This method is useful for discovery of trans-spliced RNAs and will enable us to understand the role of trans-spliced RNAs in mammalian.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子検査学

1. 研究開始当初の背景

生命には、異なった mRNA 分子がスプラ

イシングの過程で互いに融合して新しい遺伝子が生まれるトランス・スプライシング現

象が存在するが、この現象は、線虫やトリパノソームのみならず、哺乳類にも存在することが明らかにされてきている。近年、ゲノム異常による癌遺伝子とされる JAZF1-JJAZ1 融合遺伝子が、正常組織でトランス・スプライシングにより生成されることも発見され、トランス・スプライシングの役割の重要性が強く予測されている。

しかし、哺乳類におけるトランス・スプライシングを受ける遺伝子（以下、トランス・スプライシング遺伝子）の発見は、初期リンパ球分化過程など散発的なものにとどまり、その全容は不明のままである。研究の進展の最大の障壁は、トランス・スプライシング遺伝子を発見する系統的な方法論が欠如していることにあるであろう。そのため、新たな探索方法の開発およびその導入によるトランス・スプライシング遺伝子の発見が求められている。

2. 研究の目的

トランス・スプライシング遺伝子の発見には、まずトランス・スプライシング遺伝子探索を可能とする新規システムの開発が必要である。そこで、ターゲット細胞の cDNA ライブラリーからトランス・スプライシングを起こしている遺伝子を検出するために、メイトペア法を応用する。メイトペア法は遺伝子を環状化することにより両遺伝子末端の情報を効率よく選択する方法であるが、この際に複数遺伝子による環状化分子が混入し高いノイズとなることが目的の達成を妨げていた。従来、単分子の環状化 DNA 作成の効率化を期待する際には、ポリエチレングリコール (PEG) 添加等の反応溶液の工夫、核酸濃度の最適化等が試行され、結果として複数分子による環状化 DNA の頻度のある程度は下げることができても、完全に排除することは原理的に不可能であった。

新規に開発したシステムは初めてこの問題を抜本的に解決するものであり、本システムをトランス・スプライシング遺伝子発見に応用することで、未知のトランス・スプライシング遺伝子を体系的に発見することが可能となる。トランス・スプライシング遺伝子群の発見により、従来になかった生命分野そして“fusion transcriptome”という新たな遺伝子検査分野を確立していくことが研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) トランス・スプライシング遺伝子発見の高精度探索システムの構築、(2) システム条件設定、および (3) トランス・スプライシング遺伝子の探索を目標とし、以下のような方法で行った。

(1) トランス・スプライシング遺伝子発見の高精度探索システムの構築

本システムは環状化 DNA のメイトペア解析が基本であり、ターゲット細胞由来の環状化 cDNA ライブラリーにおけるメイトペア塩基配列解析から未知のトランス・スプライシング遺伝子を発見する方法である。本法は、cDNA ライブラリーの各 cDNA 単分子に固有の塩基配列部位を導入し 2 段階の ligation により、単分子のみの環状化 cDNA 形成を許し、正確なメイトペア配列解析を可能とすることである。このベクターシステムを確立するとともに条件を最適化することにより、高精度の系統的トランス・スプライシング遺伝子の探索を可能とする。

予備実験において、既に解析精度を左右するメイトペアの「ノイズ」を 100 分の 1 にまで減少させることに成功している。理論上はほぼノイズは“0”にすることができるはずであるが、この理論と実際の実験結果の差異は、DNA 結合 (ligation) における不適合結合 (mismatch-ligation) によると考えられる。次世代シーケンサーの高速大量解析能力に見合った解析精度としては、「ノイズ」が 10 万分の 1 以下の精度のシステムを確立する必要があり、この mismatch-ligation を endonuclease 酵素により排除する方法を導入し、解析ノイズが 10 万分の 1 以下の高精度のシステムを作成し、トランス・スプライシング遺伝子探索の強力なリサーチツールを確立する。

(2) システム条件設定、および (3) トランス・スプライシング遺伝子の探索

本システムでは、トランス・スプライシング遺伝子の発見を、従来にない高い精度と効率且つ優れた経済性で実施することが可能であり、実際の組織からトランス・スプライシング遺伝子を系統的に同定していくためにシステム条件設定が必要である。

具体的には、トランス・スプライシング遺伝子を模すために bcr/abl 融合遺伝子を有する CML 細胞株である K562 を対象としてシステムの最適化を行う。その後、本ベクターシステムを実際の生体組織へ応用する。対象組織としては、ヒトにおいて比較的アプローチが容易な、造血・リンパ系組織および消化器系生検組織を準備している。一方、神経系および生殖系組織等のヒトではアプローチが困難な組織に対しては当初はマウス組織を対象に始めることを考慮している。

4. 研究成果

(1) トランス・スプライシング遺伝子発見の高精度探索システムの構築

本研究は、未知のトランス・スプライシング遺伝子の発見を高い精度で行うことを可

能とする新規システムの開発および実際のトランス・スプライシング遺伝子の探索である。

新規開発したシステムはメイトペア法を基本としている。従来のメイトペア法ではDNAを環状化する際に、複数遺伝子による環状化DNAの混入が原理上不可避であり、誤ってトランス・スプライシング遺伝子と判断されてしまうため(図1*)、その解析精度は低く労力もかかり高額の実験費用を必要としていた。

新規システムの基本は、cDNAライブラリーに特異配列アダプター

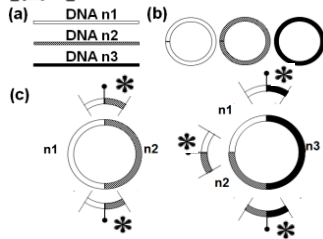
付加し、特異配列前後の酵素処理による2段階環状化で単分子環状化DNAのみを作成するものであった。予備実験を行い予想通りノイズの軽減効果があり、さらに精度を上げるべくシステム改良を行ったが、1/1000程度にノイズを減少させることが限界であった。この方法でもトランス・スプライシング遺伝子探索は可能であるが、目標としては10万分の1以下の精度を求めており、今後の展開にはノイズ排除が不十分であると判断した。

そこで、システムをさらに改良し、複数分子環状化DNAのノイズの混入を減少させるのではなく、不適格ノイズそのものを解析上で完全に排除する、高精度のメイトペア解析方法を新たに確立することに成功した。

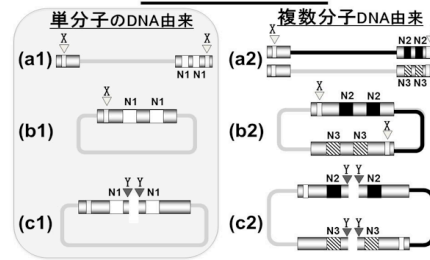
具体的には、2箇所の相同特異的配列の間に制限酵素サイトを有するアダプターをcDNA分子に付加し(図2a, b)、1段階目環状化の後(図2c)に制限酵素Yで切断し(図2d)、さらに2段階目環状化を行う(図2e)。得られた環状化DNAは、単分子DNA由来であれば同一相同配列組合せとなるが(図3a1 ⇒ d1)、複数分子DNA由来であれば異なる組合せとなる(図3a2 ⇒ d5)。

つまり、環状化DNAのアダプターの特異配列が同一であれば単分子環状DNAであり、異

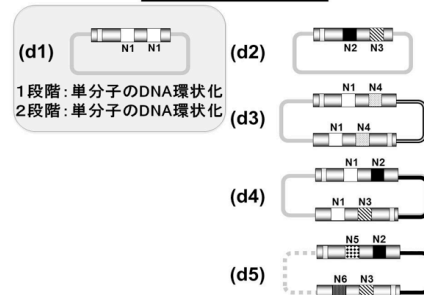
【図1】



【図3】 1段階目環状化



2段階目環状化



なれば複数分子環状DNAであると判定することができ(図4)、目的配列をコンピューター上で

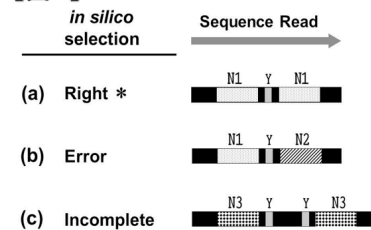
データ解析時に正確に選択することが可能である(in silico selection)。

本新規システムは、2回の環状化反応を行うだけのシンプルな方法であり、メイトペア配列解析において単分子DNA環状化分子由来のメイトペアを確実に選択できる。本法により、トランス・スプライシング遺伝子の系統的探索を容易かつ高精度・高効率に行うことが可能となった。

(2) システム条件設定

本システムの有効性および解析精度を明らかにするため、既知の融合遺伝子を含むサンプルを用いてトランス・スプライシング遺伝子を模した実証試験を行いシステムの条件設定を行った。既知の融合遺伝子を有するものとして bcr/abl 遺伝子を有する CML 細胞株を用いた。プロトコールに従い2段階環状化反応を行い、そのメイトペア断片を illumina GA で解析した結果、3億リードの有効配列解析が得られ、その内、本タグ・アダプター構造を有したリードが75%であった。さらに、その91%において、タグ解析から特異配列が同一であったクローン、つまり単分子DNA由来の環状化分子からのメイトペア解析が可能あり、最終的に BCR-ABL 融合遺伝子を確認することが実証された。この実験を詳細に

【図4】



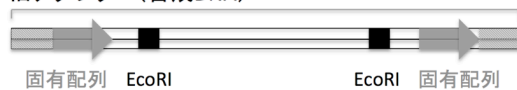
解析した結果、問題点として、(a) タグ・アダプター構造を有するリードが75%に留まり、25%にアダプター構造を有しない配列が混入していたこと、(b) 特異配列が同一であったクローンに関わらず、複数分子由来の環状化分子による偽配列ノイズが一定頻度存在することであった。

(a) については、2回目の実証実験において、定常配列に対するビオチン化オリゴによる濃縮で回収率を上げることが可能であった。

(b) については、データ解析により原因を究明したところ、問題は、2段階目のプラスミド切断時に制限酵素サイトY (EcoRI) の切断が不十分であることによると判明した。本アダプターは遺伝子合成によって作成しているが、遺伝子合成の効率は100%ではなく、約1%の割合で合成エラーが生じ得る。そのため合成エラーがEcoRIサイトに生じたアダプターは制限酵素で切断されず、ある一定の頻度でノイズを形成してしまうことが明らかとなった。そのため、新規アダプターとして、EcoRI切断DNA断片をあらためて結合 (ligation) することにより、固有配列および4カ所の正確なEcoRIサイトを有するアダプターに改良した (図5)。この新規アダプターは、Miseqシーケンサー (illumina)

【図5】

旧アダプター(合成DNA)



新規アダプター(EcoRI断片の組み合わせ)



により1500万リードの解析を行い、目標通り正しいEcoRIサイトで構成されていることを確認できた。また、本新規アダプターを導入することにより、旧アダプターで認められたノイズの除去に成功した。

以上のことから、トランス・スプライシング遺伝子探索を可能とする新規システムの確立、さらなる高精度化およびデータの解析・解釈過程の一層の簡便化に成功した。

(3) トランス・スプライシング遺伝子の探索

本研究では、トランス・スプライシング遺伝子発見の新規方法の開発とともに、実際の遺伝子探索を行っている。生体組織へ応用として、ヒトにおいて比較的アプローチが容易な、造血・リンパ系組織および消化器系生検組織を開始した。実際の解析はまだ限られており、これまでトランス・スプライシング遺伝子を疑わせるデータは得られて来ていなかった。しかし、造血幹細胞でサイトカインを加えて

培養を行った検体において新規トランス・スプライシング遺伝子候補を計3候補得ることができた (表1)。候補の中には転写因子も

【表1】

5'側配列			
Chromosome	Region	Gene symbol	配列
chr3	3q27.2	SEN2	GGGACAGAGTCTCGCTGTGTCACCC
chr9	9p24.1	KDM4C	CTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAG
chrX	Xq22.3	RBM41	GGTAATGACAGGCTCTGCTGTGTT

3'側配列

3'側配列			
Chromosome	Region	Gene symbol	配列
chr1	1p34.1	EIF2B3	ATGGTTATACAGTTGCATAGTTTFA
chr2	2p14	SPRED2	TGAGCTGTGCACTTATCTTTGGCC
chr12	12q14	CAND1	CACATAATTTGCATGAGTAAGTTTA

認められないクローンが複数得られており、周辺配列からの転写について検討している。一方、偽遺伝子 (シュード・ジーン) が遺伝子も数クローン得られた形になっており、これはメイトペア配列をゲノム情報に照合する際のエラーと考えられ、メイトペア配列照合の際のアルゴリズムを最適化し直す必要があると考えている。

研究開始時の方法の精度を上げるため、新たなシステム改良に時間を割いたことから、実際のトランス・スプライシング遺伝子の探索は緒に着いたところである。この点では一時的に時間を費やしたが、実際にはより完全なシステムの確立に成功したことから、今後の展開において、トランス・スプライシング遺伝子探索の効率はより向上することが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Imamura R, Mouri F, Nomura K, Nakamura T, Oku E, Morishige S, Takata Y, Seki R, Osaki K, Hashiguchi M, Yoshimoto K, Ohshima K, Nagafuji K, Okamura T. Successful treatment of small cell variant anaplastic large cell lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, and review of the literature. Int J Hematol. 査読有. 2013. 139-143. doi: 10.1007/s12185-012-1242-3

(2) Morishige S, Oku E, Takata Y, Kimura Y, Arakawa F, Seki R, Imamura R, Osaki K, Hashiguchi M, Yakushiji K, Mizuno S, Yoshimoto K, Nagafuji K, Ohshima K, Okamura T. A case of 8p11 myeloproliferative syndrome with BCR-FGFR1 gene fusion presenting with trilineage acute leukemia/lymphoma,

存在し興味深く、現在これら候補遺伝子について解析中である。また、解析の際に對側に遺伝子座が

successfully treated by cord blood transplantation. Acta Haematol. 査読有. 129. 2013. 83-89.
doi: 10.1159/000341289

(3) Nakamura T, Oku E, Nomura K, Morishige S, Takata Y, Seki R, Imamura R, Osaki K, Hashiguchi M, Yakushiji K, Mouri F, Mizuno S, Yoshimoto K, Ohshima K, Nagafuji K, Okamura T. Unrelated cord blood transplantation for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma: experience at a single institute. Int J Hematol. 査読有. 96. 2012. 657-663.
doi: 10.1007/s12185-012-1177-8

(4) Oku E, Nomura K, Nakamura T, Morishige S, Seki R, Imamura R, Hashiguchi M, Osaki K, Mizuno S, Nagafuji K, Okamura T. Amebic colitis and liver abscess complicated by high serum procalcitonin in acute myeloid leukemia. Kansenshogaku Zasshi. 査読有. 86. 2012. 773-777.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23367854>

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 理恵 (IMAMURA RIE)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 70309764